

REMARKS

Claims 1-28 are pending. Favorable reconsideration is respectfully requested.

The rejections of the claims under 35 U.S.C. §102(b) and §103(a) over Sakai et al. is respectfully traversed. Sakai et al. is not available as prior art against the present application.

As the Examiner points out in the Official Action, the Sakai et al. reference was published in volume 7, number 4 of the reference. In the previous response, Applicants incorrectly submitted a copy of volume 7, number 3. A copy of the correct volume 7, number 4 is submitted herewith. The date of publication is underlined on the last page: December 27, ~~1999~~. Since that date is subsequent to the August 17, 2000 international filing date of the present application, Sakai et al. is not available as prior art against the present application. Accordingly, withdraw of this ground of rejection is respectfully requested.

The rejection of Claim 20 under 35 U.S.C. §112, second paragraph, is believed to be obviated by the amendment submitted above. Claim 20 has been amended to specify lipid. Accordingly, withdrawal of this ground of rejection is respectfully requested.

The objection to the Abstract and the specification is believed to be obviated by the amendment submitted above. The specification has been amended to insert the word "Daltons" and to replace the Abstract in accordance with the Examiner's suggestion. Accordingly, withdrawal of this objection is respectfully requested.

BEST AVAILABLE COPY

Application No. 10/091,440
Reply to Office Action of July 20, 2004

Applicants submit that the present application is in condition for allowance. Early notice to this effect is earnestly solicited.

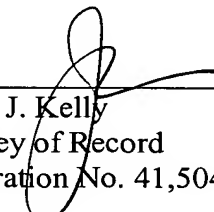
Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Customer Number

22850

Tel: (703) 413-3000
Fax: (703) 413 -2220
(OSMMN 06/04)



James J. Kelly
Attorney of Record
Registration No. 41,504

ABSTRACT

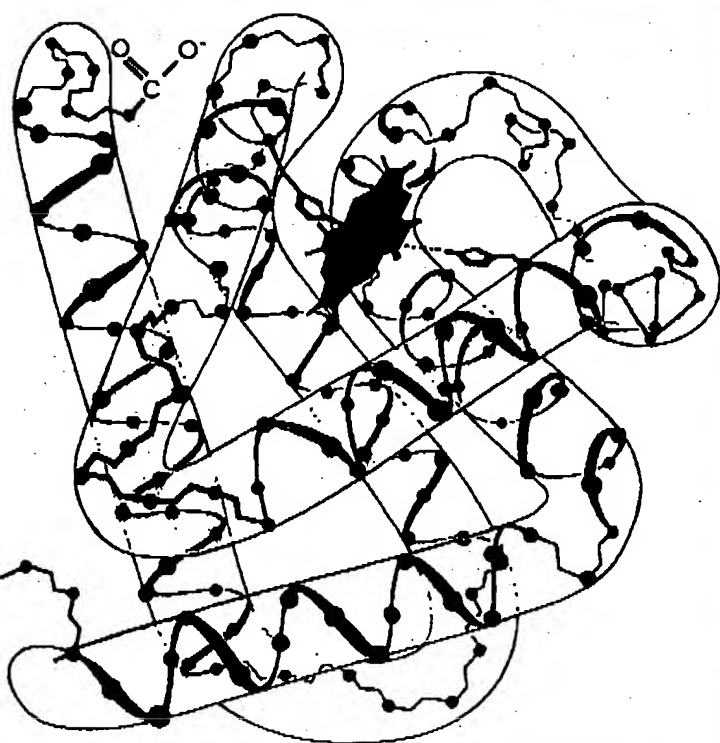
The present invention provides a method for preserving an oxygen infusion containing an aqueous suspension of molecular assemblies which contain hemoglobin or a heme compound, by:

- a) modifying the molecular assemblies with polyoxyethylene; and
- b) converting the hemoglobin or the heme compound into a deoxy-form by removing oxygen from the suspension.

人工血液

VOLUME 7
NUMBER 4
1999

日本血液代替物学会 会誌



会誌

総説: ヘモグロビン溶液のウイルス除去/
不活化

赤血球膜を三重層として捉える:
膜骨格が維持する赤血球の形態、
変形能、膜安定性

Announcement

Review:

Removal or inactivation of viruses
in hemoglobin solution

Erythrocyte membrane trilayer:
Membrane skeleton and its
maintaining erythrocyte shape,
deformability and membrane
stability

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

原著

ポリオキシエチレン修飾と脱酸素化による 酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)の長期保存

酒井 宏水、富山 賢一、宗 慶太郎、武岡 真司、土田 英俊

Long-Term Preservation of Oxygen Infusion (Hemoglobin-Vesicles) Achieved by Poly(oxyethylene)-Conjugation and Deoxygenation.

Hiromi Sakai, Ken-ichi Tomiyama, Keitaro Sou, Shinji Takeoka, and Eishun Tsuchida.

要旨

細胞型酸素輸液であるヘモグロビン小胞体(HbV)の長期保存安定度を、1年間に亘って検討した。HbVの表面はポリオキシエチレン(POE)脂質を導入して修飾し、また系内の酸素を除去しdeoxyHbとして4℃、23℃および40℃にて保存した。いずれの温度でも保存6カ月後まではHbVの分散安定度(粒径、濁度)は保持された。40℃1年間保存後では沈殿形成、脂質の分解、pHの低下、そして内包Hb総量の4%が漏出していることが認められた。他方、4℃、23℃保存では1年後も分散度が保持され、Hbの漏出も検出限界以下であった。保存前に3%あったmethHbは、徐々に減少し1カ月後には1%以下になった。これは内包した還元剤のhomocysteineが残存酸素を消費し、更にmethHbを還元した為である。酸素親和度(P_{50})は保存前38 Torrであったが、40℃保存した場合は6カ月後に33 Torrにまで低下、1年後には43 Torrにまで上昇した。他方、4℃、23℃で保存した場合はそれぞれ36 Torr、32 Torrにまで徐々に低下するに留まった。以上より、HbVは少なくとも室温で1年間の棚置き保存が可能であることが明らかとなった。

Abstract:

The stability of hemoglobin vesicles (HbV) as an oxygen infusion was tested during the storage for one year at 4℃, 23℃, and 40℃. Prior to the storage, the surface of HbV was modified with poly(oxyethylene) (POE), and the suspension was deoxygenated with nitrogen bubbling. The samples stored at 4℃ and 23℃ showed a stable dispersion state for one year, though the sample stored at 40℃ showed precipitation and lipid decomposition, a decrease in pH, and leakage of 4% of total Hb. The original methHb content of 3% gradually decreased to less than 1% in all the samples after one month due to the presence of homocysteine inside the vesicles which consumed residual oxygen and reduced the trace amount of methHb. Oxygen affinity (P_{50}), which was originally regulated to 38 Torr, reduced to 33 Torr when stored at 40℃, though it significantly increased to 43 Torr after one year. On the other hand, preservation at 4℃ and 23℃ slightly reduced the P_{50} value to 36 and 32 Torr, respectively. These results indicate the possibility that HbV suspension can be stored at room temperature for at least one year.

Keywords:

blood substitutes / hemoglobin vesicles / polyoxyethylene / preservation / deoxygenation / methemoglobin / liposome

1. 緒言

ヘモグロビン(Hb)を用いた酸素輸液(人工酸素運搬体)の開発は、分子内架橋Hb、水溶性高分子結合Hb、分子間架橋Hb、重合Hbなどの臨床試験が欧米で進行しているものの、非細胞型構造に起因する各種の副作用が明らかにされている。Hbが本来赤

血球膜に包まれている理由を考えると、Hbを内包させた細胞型のHb小胞体が適当と考えられている。

何時でも何処でも、血液型に関係なく投与することができる酸素輸液の実現には、長期間安定度高く保存できることが前提

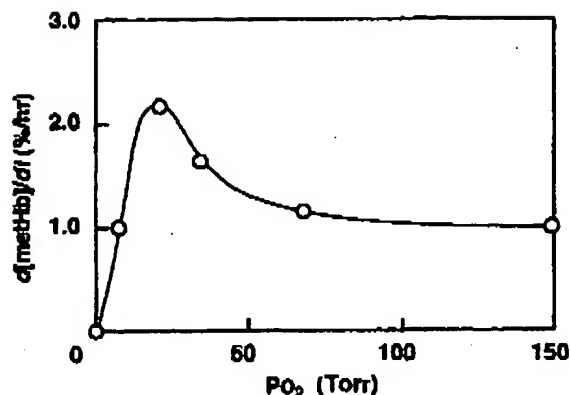


Figure 1 O₂ partial pressure dependence of the initial rate of metHb formation in HbV ([Hb] = 0.78 mM and pH 7.4). Cited from Takeoka et al., *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 539-544

となるが、Hbを用いる細胞型、非細胞型酸素輸液共通の問題点として保存中のHbの自動酸化(メト化)がある。HbO₂はスーパーオキシドラジカル(O₂[•])を遊離して自動酸化し、鉄三価のメト体(metHb)となり酸素結合能を失う。この自動酸化の抑制法として、還元剤やメトHb還元酵素系や活性酸素消去酵素を添加する方法が試みられているが^{2,3)}、溶液状態では長期安定度は十分ではない。架橋Hbやポリオキシエチレン(POE)修飾Hbの保存法として、糖類やポリオールを添加して凍結保存や凍結乾燥粉末として保存する方法が検討された⁴⁾。また、HbO₂溶液の酸化速度は酸素分圧に依存し、デオキシ型は酸化反応が進行しないことが著者らも含め多くの研究者らによって報告されており^{5,6)}(Fig. 1)、この性質を利用して最近Biopure社が動物臨床用に二年間室温横置き保存可能な重合ウシHbの酸素輸液を実現している。

しかしながら、Hb小胞体の場合はHb分子だけでなく小胞体構造も安定化する必要がある。リン脂質小胞体は両親媒性分子の集合体であり、その構造は一般的に不安定で、例えば冷蔵保存すると次第に凝集・融合が起こる。また脂質分解とそれが更にメトHb生成を促進するなどの劣化が起こる。

HbVにトレハロースなどの糖類を保護剤として添加した凍結乾燥粉末は安定である¹⁰⁾。しかしHbVの最大用途である緊急時の使用を想定すると、粉末溶解には完全に溶解するまでに時間を必要とする上、気泡の除去も必要であり煩雑さを伴う。また凍結保存の場合^{11,12)}でもその融解および投与可能な温度までの昇温に時間を要する。従って、開封後そのまま使用できる溶液状態のほうが臨床的には好ましい。

POE鎖を結合した脂質をリン脂質小胞体の表面に導入すると血中滞留時間が延長する事実は良く知られている^{13,14)}。また、Hb小胞体と血漿蛋白質との相互作用の抑制を目的として、Hb小胞体の表面にPOE鎖で表面修飾する方法が用いられている¹⁵⁾。他方、血流動態が改善されることも確認されている^{16,17)}。しかし酸素輸液の室温横置き保存に関して、POE修飾の効果は知ら

れていない。そこでHb小胞体の表面にPOEを結合させ、同時に溶液から酸素を除去することによりHb小胞体を溶液状態で保存できるのではと考え、1年間に亘った検討をしたので報告する。

2. 実験方法

2.1. ヘモグロビン小胞体(HbV)の調製

Hbは北海道赤十字血液センターから譲渡された期限切れヒト赤血球より精製して得た。Hb小胞体は既報に従い調製した^{12,18)}。一酸化炭素結合Hb(HbCO)溶液(40g/dL)に、pyridoxal 5'-phosphate (PLP, Merck Co., Germany)をHbに対して3倍モルとなるように、DL-homocysteine (Hey, Aldrich, MO, USA)を濃度5mMとなるように添加した。混合脂質粉末Presome PPG-1 (DPPC/cholesterol/DPPG = 5/5/1モル比、日本精化)を脂質濃度が4.5wt%となるようにHb溶液と混合し、4℃で終夜攪拌してHb内包多層小胞体を得た。Remolino (Millipore, MA, USA)を用いたエクストルージョン法により粒径及び被覆層数の制御を行った。FMマイクロフィルター(富士フィルム、東京)を孔径3.0, 0.8, 0.65, 0.45, 0.3, 0.22μmの順に使用した。得られたHbV分散液を生理食塩水で希釈し、超速心分離(50,000g, 60 min)後に上澄みHb溶液を吸引除去した。生理食塩水に分散させたPOE結合脂質-N-(monomethoxy polyoxyethylene-succinyl)-distearoyl phosphatidylethanolamine (POE鎖の分子量は5300、日本油脂、東京)のミセルを、小胞体外表面の脂質の0.3mol%相当分を滴下し、37℃で2時間攪拌後、4℃で終夜攪拌してHb小胞体の外表面に導入した。円筒型フラスコにHb小胞体分散液(0.5g/dL, 200 mL)を入れ、これをロータリーエバポレータに装填し回転(56 rpm)させることによって形成させた液膜に、ハロゲンランプ(500W)を用いて酸素通気下(1L/min)で3分間可視光照射し、HbCOからオキシHb(HbO₂)への配位子交換を行った。この分散液を超速心分離(50,000g, 60 min)してHbVを沈降させ、外水相生理食塩水を除去後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、再分散させてHb濃度を10g/dLとした。最後にDismic-25, 0.45μmフィルター(ADVANTEC)で濾過し、POE修飾Hb小胞体(POE-HbV)を得た。

2.2. 脱酸素化と保存条件

POE-HbV分散液2 mLを10 mL容量のバイアル瓶に入れて密封した。減菌ディスクフィルターを通し更に水蒸気飽和させた窒素の気泡を瓶内に発生させて通気し(13mL/min)、溶解している酸素を除去した。系内の酸素分圧をClark型酸素電極(酸素分圧測定装置, PO₂-100, Inter Medical社, 名古屋)によってモニターしたところ、酸素分圧は1 Torrまで低下した。HbVの酸素親和度(P₅₀)は37℃で38 Torrであるので、この操作によりHbO₂は酸素を結合していないdeoxyHbに98%以上変換されたものと判断した。保存温度は冷蔵(4℃)、室温(23℃)、恒温槽(40℃)を設定し1年間保存した。

2.3 保存後の測定項目

保存安定度評価として以下の項目の測定を行い保存前の試料と比較した¹⁹⁾。

① 試料30μLを生理食塩水で100倍に希釈し、室温において1mm

セルを用いて300~900nmまで紫外可視吸収スペクトル測定を行った。保存前の試料と比較して、新たな吸収極大の出現の有無やQ帯スペクトルの変形について検討した。また窒素バブルしてmetHbとdeoxyHbの二成分系にしてスペクトル測定し、Soret帯における405nmと430nmのピーク比からmetHb含量を測定した。

3. 結果

3-1. POE-HbVの分散状態と脂質の性状

POE-HbV調製後の粒径は 222 ± 62 nmであった(Fig 2)。3カ月後に約10%収縮して粒径は201~204 nmになったが、6カ月後にはほぼ初期の粒径に戻った。濁度の変化は認められなかったが、40℃保存の系のみ1年後に容器の底に凝集体が沈殿し、4.3%のHb漏出が認められた。他方、4℃および23℃保存の系では凝集体は認められず、Hbの漏出量も検出限界以下であった。

POE脂質の定量では、40℃保存6カ月後でもPOE鎖結合量は初期の6%程度の減少に留まった。二次元TLCの解析では、40℃保存1年後の試料のみ、リン酸が遊離したジアシルグリセロールと思われるのスポットが確認されたものの、他の保存試料では認められなかった。

比較のために、POE修飾を施さないリン脂質小胞体を各温度

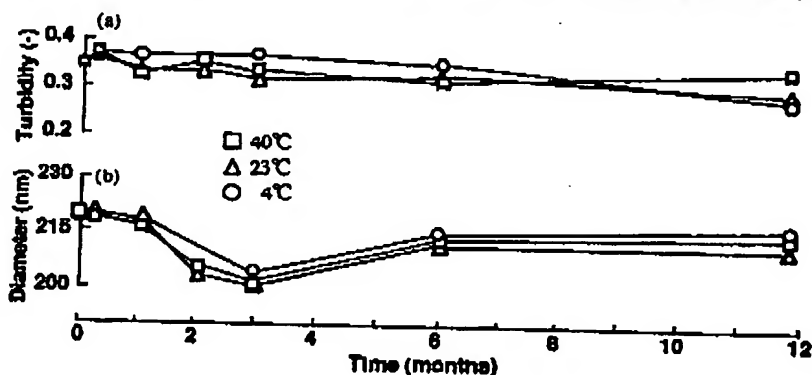


Figure 2 Changes in dispersion state of POE-modified HbV during preservation at 4, 23, and 40 °C for one year. (a) Turbidity of 10 times diluted samples at 900 nm, and (b) diameter changes measured with a Coulter particle analyzer.

において保存したところ、3日後に既に粒径の増大が認められ、1カ月後には265 nmにまで増大した(Fig. 3)。濁度は凝集体生成のため初期は増大するが、凝集体が沈殿するためその後は低下した。4℃保存の試料が粒径増大と濁度上昇において他の保存温度の試料と比較して僅かに上回っていた。

3-2. 紫外可視吸収スペクトルと酸素結合解離曲線

保存したPOE-HbVを開封して空気と接触させ紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、 λ_{max} が415, 539, 575 nmに認められ、オキシ体であることを確認した(Table 1)。全ての保存温度、保存期間において特に保存前との差異は認められなかった。

POE-HbVの酸素親和度(P_{50})はPLPの内包によって38 Torrに調節してあったが、保存に伴い徐々に変動した(Fig. 4)。40℃保存の場合は、3カ月後に P_{50} は既に33 Torrにまで低下したが、1年後には逆に43 Torrにまで上昇した。他方、4℃、23℃保存した場合はそれぞれ36 Torr, 32 Torrにまで徐々に低下するに留まった。

- ② 試料の沈殿形成の有無を目視により検査した。また試料30 μ Lを生理食塩水で10倍に希釈し、室温において1mmセルを用いて900 nmの吸光度を測定した。生理食塩水の900 nmの吸光度を対照として差し引き、試料の濁度とした。
- ③ 試料約0.2 mLをPBSで200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15 min)を行った後、上澄み液のHb定量を行い、HbV内相からの漏出率(%)を求めた。
- ④ 粒径分布は、Sub-micron Particle Analyzer Model N4-SD (Coulter Co., USA)を用いて動的光散乱法により測定した。
- ⑤ 酸素結合解離曲線はHemox-Analyzer(TCS Medical Products Co., USA)を用いて測定し、その解析から酸素親和度(P_{50})、酸素運搬効率(OTE)、Hill係数を算出した。
- ⑥ 開封後の溶液のpHを微小電極(Horiba 6378-10D, pH/ION meter F-23)にて測定した。
- ⑦ 脂質の分解を検討するため、試料約0.2 mLを凍結乾燥後、 $CHCl_3$ により脂質を抽出し、展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/28%アンモニア水=13/7/1(容量比)およびクロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水=10/4/2/2/1(容量比)を用いて二次元薄層クロマトグラム(シリカゲルプレート)を保存前と比較した。
- ⑧ 試料約0.2 mLを凍結乾燥後、約1 mLの $CDCl_3$ により脂成分を抽出しフィルター濾過後 1H -NMRスペクトル(JNM-LA500, 日本電子, 東京)を測定した。また外水相に遊離したPOE鎖を除去するため、試料約0.2 mLをPBSで約200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15 min)を行って上澄み液を除去した。沈殿をPBSで再分散させた後凍結乾燥させ、約1 mLの $CDCl_3$ により脂成分を抽出し、フィルター濾過して 1H -NMRスペクトルを測定した。POE脂質のPOE鎖メチレン基プロトンのピークは δ :3.63 ppmに、ホスファチジルコリンのコリンメチルプロトンのピークは δ :3.39 ppmに出現する。各々のプロトン積分比をB/Aとし、POE鎖の導入率は(外水相除去後の積分比B/A) \div (仕込みの積分比B/A) \times 100 から算出した。
- ⑨ 添加剤であるアロステリック因子PLPと還元剤Hcyの安定度を検討するため、6.2 mMのPLP溶液および10 mMのHcy溶液を脱気してから40℃の恒温槽内に1カ月間保存した。PLP溶液は経時的に採取してHb溶液と混合し、酸素親和度を測定した。またHcyに関しては、SH基の定量法(N-エチルマレイミド法)によりSH基の活性を保存前と比較した。

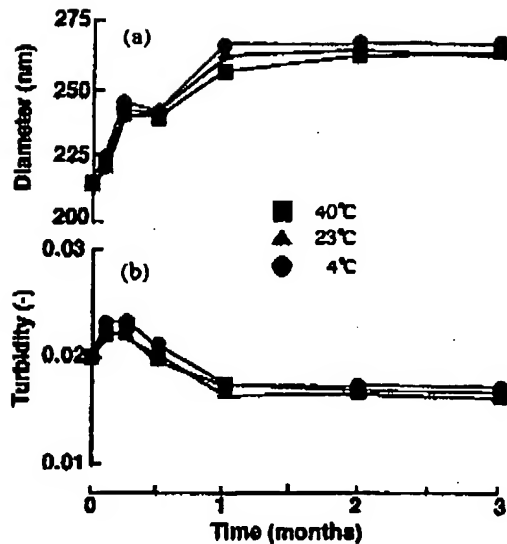


Figure 3 Changes in dispersion state of empty vesicles which were not modified with POE chains during preservation at 4, 23, and 40°C for three months. (a) Diameter changes measured with a Coulter particle analyzer, and (b) Turbidity of 10 times diluted samples at 900 nm.

Table 1 Spectrophotometric properties and P_{50} of Hb V after preservation

Conditions	Q band (nm)		Soret band (nm)	P_{50} (Torr)	pH
	α	β	γ		
before preservation	575	538	415	38	7.38
4 °C, 1 year	575	539	415	32	7.27
23 °C, 1 year	575	539	415	31	7.01
40 °C, 1 year	575	536	415	43	6.01

3-3. metHb含量

保存前のPOE-HbVのメト化率は2.8%であったが、どの保存温度においても1カ月後にはメト化率は1%以下にまで減少した。またその減少速度は保存温度が高いほど速くなった。

3-4. pHの変動

POE-HbVはリン緩衝生理食塩水に分散させてあり、初期のpHは7.38 (37°C)であった(Table 1)。1年保存後のpHは4°C、23°C保存試料では各々7.27、7.01まで低下した。他方40°C保存1年後にはpHは6.01まで低下していた。

3-5. PLP, Hcyの保存安定度

PLP溶液を脱酸素後、40°Cで加熱したところ、4週間後でも紫外可視吸光度スペクトルには顕著な変化は認められなかった。またこれをHb溶液に等モル添加して酸素親和度を測定したところ、保存前17 Torrが4週間後に15 Torrに低下するに留まり、殆ど分解していないことが明らかになった。

Hcy水溶液を脱酸素した後、40°Cにて加熱したところ、4週間後でもN-ethylmaleimideによるSH基定量ではほぼ同じ濃度を示し、酸素が無い状態ではSH基が安定に存在していることが明らかになった。

4. 考察

リン脂質小胞体は一般的に不安定な形態と考えられていたが、Hb小胞体の表面をPOE修飾することで分散安定度が保たれ、また脱酸素化することでHbや脂質、その他の添加物の酸化劣化を抑制し、結果としてHbV分散液を1年間溶液状態で保存することが可能となった。

表面をPOE修飾したリン脂質小胞体は、いわゆるstealth liposomeとして細網内皮系捕捉の抑制による血中滞留時間の延長と、抗癌剤などの薬物の効率高い腫瘍組織への運搬に利用されている。この薬物送達系(DDS)の場合は投与量が僅かであるが、酸素輸液のように大量投与を前提とした用途の場合は、より厳密な評価が必要となる。我々はPOE鎖の導入が小胞体の凝集を抑制して粘度を低下させ、迅速な血液循環と組織の酸素化に必要不可欠であることを報告した¹⁴⁾。そして今回、POE修飾が長期保存においても極めて重要であることが明らかとなった。ごく最近、2つのグループがDDSにおいてPOE修飾が保存安定度に寄与すると報告したが^{20,21)}、4°Cでの数週間の保存安定度を観測したに過ぎない。今回の実験で我々は23°Cにおいて1年間の保存安定度を確認した。

今回用いたPOE脂質はDSPEにPOE鎖がコハク酸を介してエステル結合しており、加水分解を受けやすいと考えられる。実際に40°C保存6カ月後には6%のPOE鎖が遊離していた。しかしこの程度の分解では分散安定度に特に影響を与えないものと思われた。たとえ遊離したPOE鎖が共存したまま投与しても、POEは免疫系には影響を及ぼさず、また腎臓を経由して速やかに排泄されるので、問題は無いと考えられる²²⁾。また、POEとDSPEの結合様式としては、エステル結合以外に加水分解に対してより耐性を示すアミド結合型やウレタン結合型が合成されているので、これを用いた研究を進めている。

脱酸素化により脂質の過酸化は抑えられるものの、脂質のエステル結合などの加水分解が避けられない。TLCで分析した範囲では、4°C、23°Cで1年間保存してもリン酸が遊離したジアシルグリセロールは検出されなかったが、40°Cで1年保存した試料はジアシルグリセロールと思われる分解物の存在が確認された。従ってこのときのpHの低下は脂質の分解に起因するもので、こ

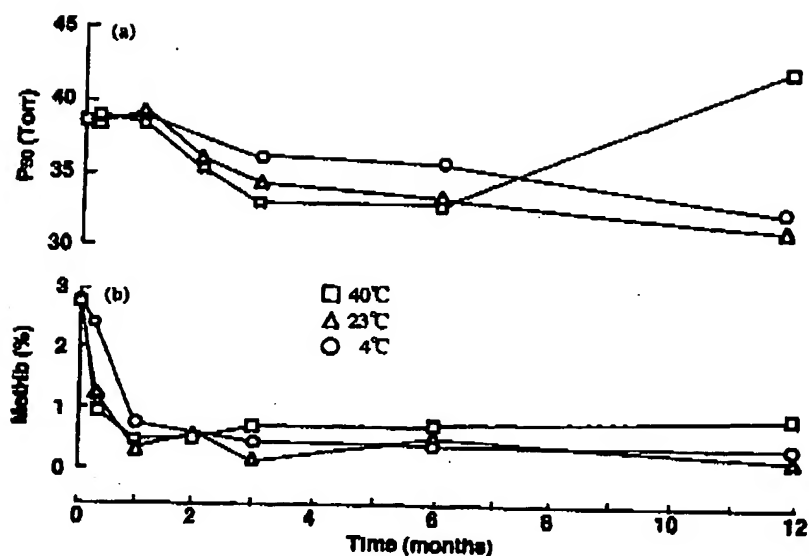


Figure 4 Changes in the oxygen binding properties of POE-modified HbV during preservation at 4, 23, and 40°C for one year (a) oxygen affinity, P_{50} , and (b) metHb content.

れが P_{50} の昇昇(43 Torr)を引き起こしたものと考察される。

HbVの初期の粒径の低下は、浸透圧の変化に拠る二分子膜中の脂質の再配列によるものと考えられる。HbVの調製工程において、Hbの内包効率を高めるために塩濃度を低く設定してあり(浸透圧は50 mOsm以下)、生理食塩水の300 mOsmに比較して低くなっている²⁰⁾。脂質二分子膜はイオン透過性が低いので、Donnan平衡に達するために内水相から外水相に水が移動し、これが初期においてHbVを収縮させたものと考えられる。その後次第にイオンの移動が起こり、最終的には安定な粒径に落ち着いたものと考えられる。周りの浸透圧に応じて小胞体の粒径が変化することは良く知られており、HbVについてもBeissingerらが報告している²¹⁾。酸素親和度の変動も内水相のイオン濃度の変動と関連させた説明が考えられる。

HbO₂がmetHbに酸化される速度は酸素分圧に大きく依存し、deoxyHbは酸素が無い状態では酸化されない。この特徴を利用して無酸素下、HbVの長期保存が可能となった。保存前HbVに含まれるmetHb含量は2.8%であったが、1カ月後には1%以下にまで低下した。これは内水相に共存するHcyに拠るものである。我々はHbVのin vivoにおける自動酸化を遅延させるために、還元剤として一連のチオール類を検討し、その中から最も効果の高いHcyを選択した²²⁾。酸素の存在下ではチオール類やアスコルビン酸などは酸素と反応して酸化され、同時にO₂などの活性酸素を生じ、これがHbの酸化を促進することがある。Kerwinらは、recombinant Hbの保存にアスコルビン酸を用いているが²³⁾、アスコルビン酸は酸素が存在するとメト化を促進することになるので、保存中は安定であるが開封後直ちに投与しないとメト化が

進行することが問題になり得る。またアスコルビン酸は強力な還元剤であるため、しばしば緑色をしたHb変異体を生成する²⁰⁾。他方Hcyは、Cysやグルタチオン、アスコルビン酸と比較して酸素とは比較的穏やかに反応し、効果的にmetHbを還元する²⁴⁾。今回、Hcyを共存させることの新たな利点を見出すことができた。また実際にHcyが無酸素条件下では、40°C、4週間以上安定であることを確認した。酸素除去操作後の溶液の酸素分圧は約1~2 Torrであり、このときの残存酸素溶解量は4μM以下となる。HbV分散液の総Hcy濃度は約1mMであり、残存酸素を消費して容器内を完全な無酸素状態とするのに十分な量と考えられる。保存後のHcy減少量は僅かであり、投与後もHcyがHbVの自動酸化抑制に充分寄与するものと考えられる。

POE-HbVの P_{50} はPLPを内水相にHbと共存させることにより調節している。保存前の P_{50} は38 Torrであり、この値は1週間保持されたが、その後低下する傾向が見られた。またこれが粒径の変動と対応していることから、Donnan平衡に達する際に、

酸素親和度に影響するPLP、Cl⁻、H⁺などアロステリック因子の濃度が変動したことも理由として考えられ、今後の検討が必要である。また40°Cにて1年保存後の P_{50} の増大は脂質の加水分解により内水相のpHが低下したことに拠る。

5. まとめ

本研究により得られた知見は以下のようにまとめられる。

1. HbV分散液から酸素を除去することでHbや構成成分の酸化を抑制できた。
2. 粒子表面にはPOE鎖を導入して保存中の粒子の凝集と融合による粒径変化、Hbの漏出を防ぐことができた。
3. 上記二つの技術を合わせることで、HbVは少なくとも室温で1年間の棚置き保存可能であることが明らかとなった。

今後は、保存試料に関して動物投与試験からその安全性を確認する必要があるが、将来医療機関の各部署、救急車、医療機関が無い遠隔地などに液体状態で酸素輸液を常備することができれば、必要時に直ちに体内に投与できることになる。更にこの技術はHbVに限定されず、細胞型/非細胞型、Hb利用/全合成系を問わず、広く酸素輸液全般に応用可能である。

謝辞

本研究の一部は、平成11年度厚生科学研究費補助金高度先端医療研究事業（人工血液開発分野）の補助によって行われた。

参考文献

1. Tsuchida E (ed). Blood substitutes: present and future perspectives Elsevier Science, Amsterdam, 1998.
2. Takeoka S, Sakai H, Kose T, Mano Y, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjugate Chem* 1997; 8: 539-44.
3. Takeoka S, Ohgushi T, Sakai H, Kose T, Nishide H, Tsuchida E. Construction of artificial methemoglobin reduction system in Hb vesicles. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1997; 25: 31-41.
4. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin-vesicles. *Bull Chem Soc Jpn* 1994; 67: 1120-5.
5. D'Agnillo F, Chang TMS. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnol* 1998; 16:667-671.
6. Matsumura S, Yamaji K, Ohki H, Kosaka K, Iwashita Y. Large scale production and characterization of lyophilized pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene (PHP) Biomater. *Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992; 20:435-8.
7. Kerwin BA, Heller MC, Levin SH, Randolph HW. Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20°C of a recombinant hemoglobin. *J Pharm Sci* 1998; 87:1062-8.
8. Levy A, Zhang L, Rifkind JM. Hemoglobin, a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol. Pathol Proc Upjohn-UCLA Symp* 1988; 11-25.
9. Balagopalakrishna C, Manoharan PT, Abugo OO, Rifkind JM. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry* 1996; 35:6393-8.
10. Rudolph AS. Freeze-dried preservation of liposome encapsulated hemoglobin: A potential blood substitute. *Cryobiology* 1988; 25: 277-84.
11. Satoh T, Kobayashi K, Sekiguchi S, Tsuchida E. Characteristics of artificial red cells, hemoglobin encapsulated in poly-lipid vesicles. *ASAIO J* 1992; 38:M580-4.
12. Hosoi F, Omichi H, Akama K, Arai K, Endo S, Nakano Y. Radiation-induced polymerization of phospholipid mixtures for the synthesis of artificial red blood cells. *Nucl Instr Methods Phys Res B* 1997; 131: 329-34.
13. Woodie MC, Lasic DD. Stencily stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1113:171-99.
14. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolongs the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; 268: 235-7.
15. Yoshioka H. Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials* 1991; 12: 861-4.
16. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Materials Res* 1998; 40:66-78.
17. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Izumi Y, Yoshizu A, Nishide H, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface-modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997; 8: 15-22.
18. Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Physical Properties of Hemoglobin Vesicles as Red Cell Substitutes. *Biotechnol Progr* 1996; 12: 119-25.
19. Hamada K, Kose T, Ohgushi T, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Assay systems for the components of red cell substitutes (NRC). *Artif Blood* 1995; 3: 96-101.
20. Meyer O, Kirpotun D, Hong K, Sternberg B, Park JW, Woodie MC, Papahadjopoulos D. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotide. *J Biol Chem* 1998; 273: 15621-7.
21. Singh M, Ferdous AJ, Jackson TL. Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment. *J Controlled Release* 1999; 59: 43-53.
22. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994; 83: 601-6.
23. Takeoka S, Ohgushi T, Terasa K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 1996; 12:1755-9.
24. Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. Liposome-encapsulated hemoglobin as a red cell surrogate; preparation scale up. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1988; 32: 58-63.
25. Kerwin BA, Akers MJ, Apostol I, Moore-Einsel C, Etter JE, Hess E, Lippincott J, Levine J, Mathews AJ, Revilla-Sharp P, Schubert R, Looker DL. Acute and long-term stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications. *J Pharm Sci* 1999; 88: 79-88.
26. Moxness MS, Brunauer LS, Huestis WH. Hemoglobin oxidation products extract phospholipids from the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry* 1996; 35: 7181-7.

投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、

第2頁以降に和文抄録、Keywords (英文で6個程度) を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。

- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では1, 2, 3, 4などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年; 巻数: 頁~頁、とし、誌名の省略は医学中央雑誌または

Index Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地: 発行書店、年号; 頁~頁、の順とする

- 1) 太田和夫 移植医療と社会、医学のあゆみ 1993;164 442-6.
- 2) 砂本順三, 岩本 清 リボソームの調製、野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編、リボソーム、東京: 南江堂, 1988;21-40.
- 3) Fowler SA, Andracks M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casseel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22 27-42.
- 4) Reichert CM, Kelly VL, Mucher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

●宮尾秀樹(委員長)、池淵研二、武岡真司、友田輝夫、仲井邦彦、西出宏之、堀之内宏久、村田満、山内紘一、渡辺真純●

日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 高山

人工血液 vol. 7 (4) 1999年12月27日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.